

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-252545

(43)Date of publication of application : 19.10.1988

(51)Int.Cl. B01J 20/26
 // C08F 8/42
 G01N 30/48

(21)Application number : 62-087399

(71)Applicant : FUNAKOSHI YAKUHIN KK

(22)Date of filing : 09.04.1987

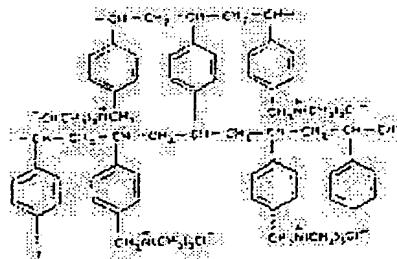
(72)Inventor : HAYATSU HIKOYA
 SAITO HIROSHI

(54) MUTAGEN ADSORBENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To simply and efficiently adsorb and concentrate a mutagen, by supporting a metal porphyrin by an anion exchange resin in a ratio of 5W100 μ m mol./g to prepare a mutagen adsorbent.

CONSTITUTION: A selected anion exchange resin is brought into contact with an aqueous solution of a metal porphyrin compound at 10W50° C for 2W24hr. as necessary, in the presence of an org. solvent such as acetone to prepare a mutagen adsorbent. In this case, the ratio of the metal prophyrin compound to the anion exchange resin is 5W50 μ m mol. pref., about 25 μ m mol./1g of the resin on a dry wt. basis. As the metal porphyrin compound, there is copper phthalocyanine sulfonate and, as the anion exchange resin, there is a strong basic anion exchange resin represented by formula I.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Claims

1. A mutagen adsorbent produced by supporting a metallic porphyrin compound on an anion exchange resin, the metallic porphyrin compound being supported in an amount of
5 5 to 100 μmol per g of the anion exchange resin.

⑫ 特許公報 (B2)

平4-698

⑤ Int. Cl.⁵B 01 J 20/26
G 01 N 30/48

識別記号

H
Z

庁内整理番号

6939-4G
7621-2J

②④ 公告 平成4年(1992)1月8日

発明の数 1 (全7頁)

⑥ 発明の名称 変異原吸着剤

Application no.

Date of
filing

②特 願 昭62-87399

⑤公 開 昭63-252545

②出 願 昭62(1987)4月9日

③昭63(1988)10月19日

⑦ 発明者 早津 彦哉 岡山県岡山市津島本町18-4

⑦ 発明者 斎藤 寛 岡山県赤磐郡山陽町山陽団地4-4-6

⑦ 出願人 フナコシ株式会社 東京都足立区保木間2丁目7番15号

⑦ 代理人 弁理士 清水 修

審査官 吉見 京子

Partial translation
attached 1

2

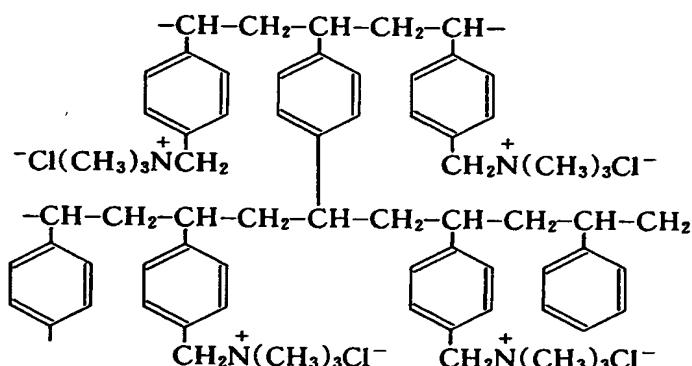
⑧ 特許請求の範囲

1 金属ポルフィリン化合物を、アニオン交換樹脂に1%あたり、5~100μモルの割合で担持させたことを特徴とする変異原吸着剤。

2 金属ポルフィリン化合物が、銅フタロシアニン

*ンスルフォン酸又は銅テトラフェニルポルフィンスルフォン酸の、いずれかであることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載変異原吸着剤。

3 アニオン交換樹脂が、構造式



で表わされる強塩基性陰イオン交換樹脂であることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載の変異原吸着剤。

発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、自然に起きる突然変異よりも高い比率で、突然変異を誘発する化学物質である、変異原を吸着する、変異原吸着剤に関するもので、様々な被検体中に極めて微量しか存在しない変異原を吸着濃縮し、検出するために用いられるものである。

従来の技術

変異原は、自然に起きる突然変異よりも高い比率で突然変異を誘発する化学物質であつて、自然

20 に、或いは人工的に產生され、広範囲に及ぶ環境中に存在している。その代表的なものは、ベンゾ

ピレン等の多環式化合物、アクリジン核を有するアクリジン色素類、並びにニトロソグアニジン等のアルキル化剤である。変異原は様々な経路で產

25 生されるが、最も良く知られているのは、肉や魚を加熱した際に生成されるものである。その他、喫煙者の尿中にも検出されており、生体における

代謝過程においても產生されることが分かつている。このように、変異原は、ヒトの体液や排泄物、或いは河川、下水等の環境中に広範囲に含まれている。これら変異原の多くは発癌性を有する化学物質であり、ヒトにおける癌の発現との関係が注目されている。従つて、変異原を検出し、更には、その構成成分を同定することは、発癌物質をスクリーニングする上で極めて重要な作業である。

しかしながら、上記の検体中の変異原含有量は極めて微量であり、被検試料に含まれる変異原を正確に測定することは非常に困難である。従来、XAD樹脂法等が用いられていたが、これらの従来方法では、複雑な操作を必要とする上、夾雜物質の阻害作用を受け、変異原を正確に検出することができないという問題点を有していた。また、これら従来法においては、抽出効率が低いために抽出液を精製する必要があり、処理行程が複雑で、発癌物質を迅速に検出し、スクリーニングするには不適当であった。

そのような、従来法の欠点を解決する目的で、特開昭59-989789号を本願発明者は提案している。この方法は、脱脂綿に銅フタロシアニンスルフォン酸を共有結合させたものであつて、主として食品中に多く含まれている、多環系化合物を特異的に吸着することが示された。この綿を用いて変異原を検出するには、試料と綿を振とうするバッヂ法により変異原を吸着させるか、カラムに綿を充填し、次いで被検試料を含む溶液を適用して変異原を吸着させた後、変異原をアンモニア含有メタノールで溶離させる。次いで、得られた溶出液を、カラムクロマトグラフィーやTLC(薄層クロマトグラフィー)等で数回精製した後、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)等で検出同定し、

必要に応じて各成分を分離する方法を取つていた。しかるに、この綿を用いた方法によると、変異原以外の物質までも吸着されるばかりか、穏やかな条件下では変異原が溶離しないという問題点

5 があつた。即ち、変異原はアンモニア含有メタノールという比較的厳しい条件下でこれら不純物に伴つて溶離されるので、得られた抽出液を何度も繰り返して精製しなければならず、手間を要する上、精度が低下する恐れがあつた。従つて、短時

10 間に、発癌物質をスクリーニングするための、より簡便で有効な変異原の検出方法の開発が強く望まれていた。

発明が解決しようとする問題点

本発明は上述のごとき問題点を解決しようとす
15 るものであつて、変異原を簡便に効率良く吸着濃縮し、穏やかな条件下でも変異原を溶離し、抽出精度が低下する恐れのない、短時間で発癌物質をスクリーニングするための、より簡便で有効な変異原の検出剤を得ようとするものである。

20 問題点を解決するための手段

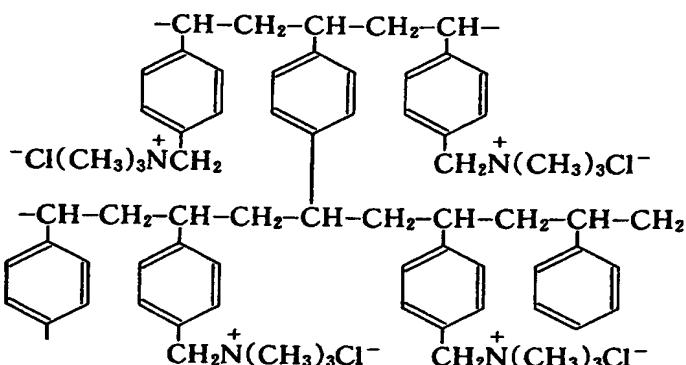
本発明は上述のごとき問題点を解決するため、金属ポルフィリン化合物を、アニオン交換樹脂に1gあたり、5~100μモルの割合で担持させたことを特徴とするものである。

25 本発明者等は、変異原を簡便に効率良く、吸着濃縮することのできる変異原吸着剤を開発することを目的として、銳意研究を重ねた結果、アニオン交換樹脂に、金属ポルフィリン化合物を担持させたものが、広範囲に及ぶ変異原を特異的に吸着

30 すると共に、吸着された変異原が穏やかな条件、例えばメタノールのみで容易に溶離され得ることを見出し、本発明を完成するに至つた。

本発明に用いられるアニオン交換樹脂は、構造式

5



6

で表わされる、強塩基性陰イオン交換樹脂を用いるが、そのうち特に、多孔性の樹脂が好ましい。また、金属ポルフィリン化合物の金属としては、銅、鉄、亜鉛、コバルト及びニッケル等、ポルフ
イリンとしては、フタロシアニンスルfonyl酸を
初め、テトラフェニルポルフィンスルfonyl酸及
びテトラフェニルポルフィンカルボン酸等から選
択されるものを用いることができる。本発明の変
異原吸着剤を得るには、選択したアニオン交換樹
脂と金属ポルフィリン化合物の水溶液とを、必要
に応じて、アセトン等の有機溶媒の存在下、10～
50°Cの温度において、2～24時間、好ましくは約
35°Cにおいて、約10時間接触させれば良い。アニ
オン交換樹脂に対する金属ポルフィリンの割合
は、樹脂の乾燥重量1g当たり、5～50μモル、
好ましくは約25μモルである。この様にして得ら
れた変異原吸着剤は、多孔性の樹脂の形態を維持
しているため、カラム等に容易に均一に充填する
ことができ、取扱い上、極めて便利である。

本発明の変異原吸着剤を用いて、変異原を検出するには、この吸着剤を通常の方法でカラムに充填し、被検試料を適用し、変異原を吸着した後、メタノールで変異原を溶離する。得られた溶離液は後述の実施例に示すように、高濃度で変異原を含有しており、しかも不純物の含有量が少ないために、そのままTLCにかけ、成分を分離することができ、場合によつては成分の同定もできる。次に、所望により、TLCプレートの必要な部分を切り取つて、抽出後、HPLCにかけ、標準物質のクロマトグラムと比較することにより、変異原を同定することができる。

以下、実施例及び試験例を挙げて本発明を更に詳しく述べる。

実施例 1

(1) 変異原吸着剤Aの調製

10mM銅フタロシアニンスルfonyl酸水溶液
100mLに、アセトン100mLを加え、良く混合した
後、硝酸型の強塩基性陰イオン交換樹脂(4
g)を入れ、約35°Cで、約10時間振とうした
後、樹脂を濾取、乾燥する。得られた変異原吸
着剤Aは、強塩基性陰イオン交換樹脂1gに対
し、25μモルの銅フタロシアニンスルfonyl酸
を含有している。

(2) 肉汁中の変異原の分離同定

Defco Beef Extract(Lot. #0126-01-8)
10gを量り取り、500mLの水に溶解させて肉汁
溶液を形成する。つぎに前記の、変異原吸着剤
Aを、2.5g注射器のカラムに詰め、水50mLで
洗浄した後、再度水50mLでカラムを洗浄した。
このカラムに肉汁溶液を、流速2.0mL/分で流
し、変異原を吸着させた。次いで、カラムを水
で洗浄後、メタノールで変異原を溶離させる。
溶離液を濃縮すると、13mgの油状物が得られ
た。これはサルモネラ菌を用いるエイムス
(Ames)法のブレインキュベーション変法
[ヤハギら(T.Yahagi et al.)、ミューテーシ
ョン・リサーチ(Mutation Res.)48、121～
130(1977)]によれば、TA98菌、+S9で、
225000復帰コロニー数に対応する変異原性を持
つていた。次いで、油状物をシリカゲルプレ
ートを用いてTLC(展開液：クロロホルムとメタ
ノールの5:1混液、検出：UVランプ)にかけ、
変異原を分離し、図1に示す各フラクションの
変異原性(復帰コロニー数)を求めた(図
1)。焼き肉中の変異原性の主要部分を占める
MeIQx(2-アミノ-3,8-ジメチルイミダ

ゾ[4, 5-f]キノキサリン)に対応するRf値0.38~0.46部分(矢印)を、メタノール抽出後濃縮すると、0.7mgの油状物が得られた。この油状物の変異原性、各ステップでの回収率とから、元の肉汁に含まれるMeIQx量を計算した結果、表1に示すように、Extract1 g当たり104ngのMeIQxが含まれることが分かった。他方、この抽出物を、さらにHPLCイナートシルODS-10カラムによる逆層クロマト、溶出液:10mM辛酸アンモニウムと、13%アセ*

* トニトリル混液、溶出速度: 1 ml/分、検出: UV検出器(254 μm)にかけて得られた結果を、図2に示す。なお、矢印で示した保持時間34分のピークは、標品のMeIQxとの同時クロマトグラフィー法により、MeIQxと同定できた。なお、上記のプロセスは、タカハシら(M.Takahashi et al.) の方法[カルシノジエネシス(Carcinogenesis) 6, 1195-1199(1985)]よりも、2ステップ以上簡略化されている。

表1 Beef Extract中のMeIQx含有量

変異原性 (復帰コロニーニー数)	MeIQxの定量値(ng)	MeIQxの回収率(%)	MeIQx含量(ng)
Beef Extract(1g)	-	-	104
変異原吸着剤Aの濃縮で得られた油状物質(1.3mg)	22000	-	86
TLCで得られたMeIQx分画(0.07mg)	5700	-	73
HPLCで得られたMeIQx分画	2000	52*	83

*は、この分画の変異原性から求めた。標品MeIQx43ngは、1400復帰コロニーを与える。

(3) 尿中の変異原の分離

上記(1)で調製した変異原吸着剤A1.0 gを、25注射器のカラムに詰め、水50ml、メタノール50ml、再度水50mlで洗浄する。次いで、このカラムにヒト(喫煙者)の尿400mlを流し、変異原を吸着させる。次いで、食塩水及び水でカラムを洗浄後、メタノールで変異原を溶離させる。30溶離液を濃縮し、サルモネラ菌を用いるエイムス(Ames)法のプレインキュベーション変法で、変異原性を検討したところ、TA98菌、+S9で520復帰コロニー数に対応する変異原性が見出された。なお、非喫煙者の尿には50~10035復帰コロニー数に対応する変異原性があることが知られている。

実施例 2

(1) 変異原吸着剤Bの調製

銅フタロシアニンスルfonyl酸の代わりに、40銅テトラフェニルポルフィンスルfonyl酸を用いて、上記実施例1の(1)に従つて変異原吸着剤Bを調製する。

(2) 変異原物質の吸着率と回収率

上記の変異原吸着剤Bの1.0 gを、注射器のカラムに詰め、水50mlで洗浄した。そして、次の変異原物質: 3-アミノ-1, 4-ジメチル-5H-ピリド[4, 3-b]インドール(化合物1)、2-アミノ-6-メチルジピリド[1, 2-a:3', 2'-d]イミダゾール(化合物2)、及びp-ニトロフェノールナトリウム(化合物3)の水溶液(0.1~0.2μモル/水5ml)を、各々カラムに流速2.0ml/分で流し、変異原物質を吸着させた。次いで、水20mlで洗浄後、メタノール20mlで各々の変異原物質を溶離させ、吸着率と脱着回収率を求めた。

表2 吸着率と回収率

化合物	吸着(%)	回収(%)
(1)	57	46
(2)	61	61
(3)	100	0

実施例 3

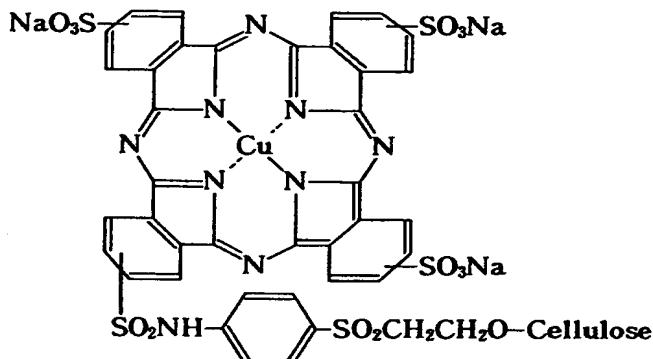
変異原吸着剤Aの繰り返し使用

実施例1の(1)に従つて、変異原吸着剤Aから変

異原を溶離させた後、カラムを水50mL、メタノール50mL、及び水50mLで洗浄し、変異原吸着剤Aを再生する。この再生したカラムを用いて、実施例1の(1)と同じ操作を行ない、肉汁溶液の変異原性を求めたところ、実施例1の(1)で求めた値とほとんど差がなく、本発明の変異原吸着剤を繰り返し*

*使用できることが分かつた。

次に本発明の変異原吸着剤Aの変異原吸着回収効果を明確にするため、前記従来公知の、特開昭59-989789号に示す方法（以下青綿法と言う）との比較を行なつた。尚この青綿法に用いる綿の構造式は、下記に示す通りである。



試験例 1

青綿法との比較

上記実施例1の(1)で調製した、変異原吸着剤A 20 A1.0gを、注射器のカラムに詰め、水50mLで洗浄した。次いで、変異原物質：3-アミノ-1, 4-ジメチル-5H-ピリド[4, 3-b]インドール（化合物1）、2-アミノ-6-メチルジピリド[1, 2-a:3', 2'-d]イミダゾール²⁵（化合物2）、p-ニトロフェノールナトリウム（化合物3）、MeIQx（化合物4）、2(2-キノキサリニルメチレン)ヒドラジンカルボン酸メチルエステル-N¹、N⁴-ジオキシド（化合物5）、及びN-ニトロソモルフォリン（化合物6）の、³⁰水溶液（0.1～0.2μモル／水5mL）の各々を、カラムに流速2.0mL／分で流し、変異原物質を吸着させる。次いで、水20mLで洗浄後、メタノール20mLで変異原を溶離させ、吸着率と脱着回収率を求め、青綿法と比較した（表4）。なお、青綿法では、バツチ法により、50mgの綿を各変異原物質の水溶液に入れ、振り混ぜる操作を2回行なうことによって変異原物質を吸着させた。

表4に示す様に、本発明の変異原吸着剤Aを用いれば、青綿法に比べ、簡便な操作で、変異原を吸着でき、しかも多くの変異原物質を効率良く吸着回収できる。

表4 変異原吸着剤Aと
青綿法による綿の
変異原物質の吸着
率と脱着回収率

化合物	変異原吸着剤A		青綿法による綿	
	吸着(%)	回収(%)	吸着(%)	回収(%)
(1)	93	78	97	9
(2)	71	71	90	90
(3)	99	0	16	15
(4)	83	83	92	46
(5)	93	93	47	36
(6)	12	12	0	0

発明の効果

本発明による変異原吸着剤は、上述のごとく、精製を繰り返し行なう必要がないので、試料中の変異原を短時間に分離し、迅速にスクリーニング³⁵することができる。従つて、本発明の変異原吸着剤は、様々な環境中に存在する変異原の簡便な濃縮検出法を提供するものであり、環境衛生上極めて有用である。更には、該吸着剤を用いて、ヒトの体液や尿、あるいは糞便中の変異原を高精度に⁴⁰分離検出できるので、医学的にも有用である。また、本発明の変異原吸着剤は、繰り返し使用することもできるので、作業能率の向上、並びに経済的な効果が期待できる。

11

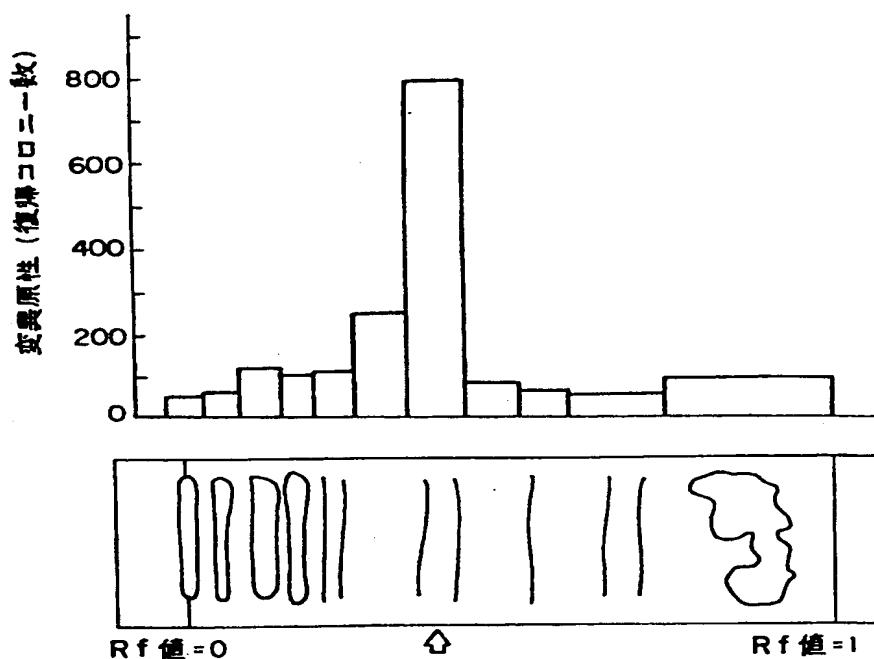
12

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の変異原吸着剤Aを用いて得られたDifco Beef Extract(Lot. # 0126-01-8)の抽出、濃縮液の変異原含有状態を示す

TLCの模写図である。第2図は、第1図の場合と同様にして得られた抽出、濃縮液をさらにHPLCにかけて得られたクロマトグラムの模写図である。

第1図



第2図

